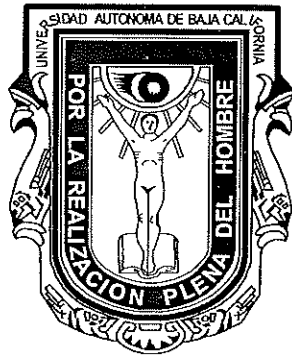


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA
CALIFORNIA**

**FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
POSGRADO EN OCEANOGRAFÍA COSTERA**



“Inhibición del crecimiento de actinomicetos de sedimentos marinos por interacciones ecológicas entre ellos mismos”

Tesis que para obtener el grado de Maestro en Ciencias

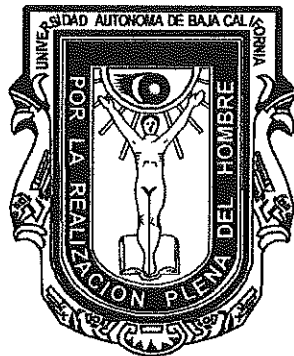
presenta:

Alejandra Prieto Davó

Ensenada, Baja California. Mayo de 2002

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS POSGRADO EN OCEANOGRAFÍA COSTERA



“Inhibición del crecimiento de actinomicetos de sedimentos marinos por interacciones ecológicas entre ellos mismos”

Tesis que como requisito para obtener el grado de maestro en ciencias presenta:

Alejandra Prieto Davó

Aprobada por:

William Fenical

Director de tesis
Dr. William Fenical

Roxana Rico Mora
Sinodal

Dr. Roxana Rico Mora

Luis Walter Daesslé Heuser
Sinodal

Dr. Luis Walter Daesslé
Heuser

ESTA ES PARA MI MADRE, POR
AYUDARME A CONVERTIR MIS SUEÑOS
EN REALIDAD

AGRADECIMIENTOS

- A mi mamá porque sin su ayuda esto jamás hubiera sido posible.
- Al CONACyT y a la FUNDACIÓN TELMEX, por su apoyo económico durante la maestría.
- A la Universidad de California en San Diego (UCSD) y al Scripps Institution of Oceanography, por permitirme el acceso a sus instalaciones.
- Al Dr. William Fenical, por apoyarme y ayudarme durante el desarrollo de esta tesis (con todo y que perdí el " mud missil", je je je).
- A la Dr. Roxana Rico Mora y al Dr. Walter Daesslé por sus observaciones y concejos.
- A Paul Jensen, por guiarme durante todo este proceso y por ser mi aval para la renta (igracias!).
- A Tracy Mincer, por sus todos los concejos e ideas.
- A Luis, por su apoyo y paciencia, como siempre.
- A la maestra Irma Soria, por su apoyo, sus concejos y su amistad incondicional durante todos estos años.
- A mi buen amigo Tonatihu que me ayudó con los mapas y me vino a visitar muchas veces (je je je).
- A Linda y Erin, por su amistad y compañía tanto en las fiestas como en las histerias.
- A todo el laboratorio Kaplan: Tatum, Chris, Sara, Matt y Stephanie por su amistad y apoyo.
- A Olvin por ayudarme con las mil y un cajas Petri y a Eddie por llevarnos a hacer los muestreos.
- A todos los estudiantes y voluntarios que estuvieron en Scripps durante mi estancia y que hicieron que el día y el "lunch" fueran más divertidos: Lik, Tanja, Greg, Eliane, Sebastian, Alan, Melanie, Eric y Shannon.
- A todos mis amigos que sin importar la distancia siguieron en contacto y esperaban con ansia mi regreso.

GRACIAS

RESUMEN

Se llevaron a cabo 2 muestreos de sedimentos marinos en los meses de Septiembre y Noviembre del 2001 dentro de un cuadrante de 0.2 km² con una topografía no muy accidentada (30-53 metros) y cercano a la costa de La Jolla, California, E.U.A. Se obtuvieron más del 80% de las bacterias pertenecientes al orden de los Actinomicetales encontradas en las 41 muestras tomadas. Se realizó un análisis ecológico en el cual se evaluaron la presencia, crecimiento en diferentes medios de cultivo, requerimiento de sodio para el crecimiento e interacciones químicas entre estos microorganismos. En 0.2 km² de superficie encontramos al menos 370 actinomicetos que pueden ser separados en 7 grupos con características morfológicas distintas. El 28% de ellos depende altamente de condiciones salinas para su crecimiento. El 14% de ellos puede considerarse como estrictamente marino ya que requiere de sodio para su crecimiento. Al menos el 5% de la población total que se pueda encontrar en el cuadrante utiliza estrategias de inhibición de crecimiento contra microorganismos de su orden y/o presentes en su hábitat. Al menos 12% de la población presente en el cuadrante muestra interacciones causadas por factores químicos autorreguladores.

ÍNDICE

CONTENIDO	Página
Antecedentes -----	1
Justificación -----	4
Introducción -----	6
Objetivos -----	13
Metodología -----	13
Área de estudio -----	13
Medios de cultivo -----	17
Pruebas de crecimiento en agua de mar y agua desionizada -----	19
Identificación Gram -----	19
Bioensayos -----	19
Resultados -----	21
Discusión -----	34
Distribución y crecimiento de los actinomicetos aislados -----	34
Crecimiento en diversos medios de cultivo -----	37
Requerimiento de agua de mar para el crecimiento -----	38
Bioensayos de inhibición del crecimiento -----	40
Resultados inesperados -----	44
Conclusiones -----	47
Bibliografía -----	48
Anexo I -----	52

LISTA DE TABLAS

	Página
TABLA I. División por grupos de las cepas de actinomicetos utilizadas en los Bioensayos-----	24
TABLA II. Porcentaje relativo de actinomicetos por muestra -----	27
TABLA III. Actinomicetos que mostraron actividad antimicrobiana en los Bioensayos-----	30
TABLA IV. Inhibición del crecimiento de cepas de actinomicetos con esporas observada en los bioensayos-----	31
TABLA V. Cepas que estimulan el crecimiento y estimulan o detienen la Esporulación-----	33

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Área de estudio -----	14
FIGURA 2. Número de cepas de actinomicetos aisladas por estación -----	23
FIGURA 3. Crecimiento de cepas de actinomicetos en diferentes medios de cultivo-----	26
FIGURA 4. Requerimiento de agua de mar en el crecimiento de las cepas de actinomicetos aisladas.-----	28

ANTECEDENTES

Una de las actividades biológicas que más ha sido buscada en las últimas 2 décadas es la antibiosis. El rápido aumento de la resistencia de bacterias patógenas a los antibióticos comerciales, ha generado un gran interés en la búsqueda de nuevas fuentes de antibióticos para seguir combatiendo enfermedades (Wiener, 1996). Las diferencias entre el medio terrestre y marino convierten a este último en una fuente importante de nuevos productos naturales, ya que podrían generar en los organismos rutas biosintéticas dedicadas a producir compuestos completamente distintos a los encontrados en el medio terrestre (Jensen y Fenical, 1994).

Los primeros indicios de antibiosis en las bacterias marinas fueron mostrados por Rosenfeld y Zobell (1947) y Grein y Meyers (1958), quienes demostraron que las bacterias marinas producen agentes antimicrobianos. En la actualidad, se sabe que los microorganismos marinos, efectivamente, generan productos naturales que no se presentan en sus contrapartes terrestres (Fenical y Jensen, 1993), muchos de ellos con actividades antibióticas, anticancerígenas y/o anti-inflamatorias (Bernan, 2001).

Existen varias teorías acerca del significado de la producción de compuestos antibacterianos por microorganismos. Las primeras proponían que dicha producción se daba simplemente como resultado de desechos en las rutas metabólicas secundarias y que éstos no presentaban ninguna función específica dentro de la vida del organismo (Williams y Vickers, 1986).

Sin embargo, trabajos como los de Demain (1980) y Weiner (1996), apoyan fuertemente la teoría de que los microorganismos generan estos compuestos como armas químicas que son utilizadas como estrategia de defensa dentro de su ambiente.

Son pocos los trabajos que discuten la competencia química entre microorganismos marinos. Lemos *et al.* (1991) mostraron el dominio de cepas de bacterias marinas productoras de antibióticos (*Alteromonas* sp.) sobre otras no productoras. Slattery *et al.* (2001) apoyan la teoría de que la competencia entre microorganismos marinos es la fuerza selectiva que promueve la biosíntesis de compuestos antimicrobianos, ya que el 22.6% de las cepas bacterianas utilizadas en su ensayo indujeron la producción de histamicina en *Streptomyces tenjimariensis* al ponerlas a competir directamente. Long y Azam (2001) encontraron actividad antagónica en algunas cepas aisladas de la zona pelágica del océano, y concluyen que este tipo de interacciones entre bacterias puede contribuir a la variación en la estructura de las comunidades microbianas marinas.

Asímismo, son pocos los estudios realizados acerca de la distribución y contribución ecológica de los actinomicetos dentro de su hábitat. Algunos de ellos fueron hechos por Weyland entre los años sesentas y ochentas (Weyland, 1981). En ellos se muestra que el número de actinomicetos encontrados en localidades marinas era mucho menor que el de los encontrados en los hábitats terrestres y que la proporción entre los actinomicetos y las bacterias de otros grupos aumentaba en muestras de profundidades mayores (Goodfellow y

Haynes, 1984). Jensen *et al.* (1991) muestran la relación de los grupos taxonómicos de los actinomicetos aislados en sedimentos marinos con la distribución que tienen en zonas cercanas a la costa. También muestran los requerimientos de agua de mar para el crecimiento de las cepas aisladas.

La información acerca de las interacciones ecológicas y químicas entre los actinomicetos y otros microorganismos, ya sean de su mismo grupo o hábitat, simplifica enormemente la búsqueda de nuevos compuestos con actividades biológicas. El presente estudio analiza algunos puntos de la ecología química de estos microorganismos como son: el crecimiento en condiciones salinas y los procesos de inhibición y estimulación de crecimiento que se dan por las interacciones entre ellos mismos. También se identifican cepa bacterianas que pueden ser de importancia para investigaciones futuras dentro del área de la farmacología marina.

JUSTIFICACIÓN

Debido a que los actinomicetos pertenecientes al ambiente marino son, a la fecha, el nuevo grupo de microorganismos más prolífico en cuanto a la producción de antibióticos (Fenical y Jensen, 1993), es importante obtener la mayor información posible referente a las relaciones ecológicas que se llevan a cabo entre miembros de este grupo.

El conocer y evaluar las razones por las cuales algunos de los actinomicetos producen antibióticos, así como las condiciones que los llevan a hacerlo, conlleva a un avance significativo dentro del área del descubrimiento de nuevos productos naturales marinos. Una manera de simplificar la búsqueda de compuestos importantes con nuevas estructuras y propiedades es el estudiar las relaciones intra e interespecíficas que se dan entre los actinomicetos.

En trabajos anteriores realizados por Lemos *et al.* (1991) y Slattery *et al.* (2001) se presentan solamente interacciones entre actinomicetos conocidos como productores de antibióticos (streptomicetos) y bacterias sensibles a los mismos (*Bacillus subtilis*). El trabajo presentado por Long y Azam (2001) es uno de los más recientes en discutir el significado ecológico de estas interacciones. Sin embargo, también utiliza a patógenos humanos como microorganismos de prueba.

El presente trabajo analiza las interacciones antimicrobianas entre actinomicetos de sedimentos marinos que habitan en un mismo nicho ecológico. Se estudian diversos aspectos relacionados con la ecología de una comunidad de actinomicetos presente en una zona oceánica determinada. De esta manera, se genera un estudio base de la ecología química de estos organismos, que sirve como punto de partida hacia futuras investigaciones en áreas como la ecología, química y farmacología marina.

Si se considera que los actinomicetos tienen cierta habilidad para producir antibióticos y que algunas veces esta producción se da como resultado de la comunicación entre bacterias (Rice *et al.*, 1999), es factible sugerir que los actinomicetos de sedimentos marinos utilizan metabolitos secundarios como estrategia de inhibición de crecimiento para competir con microorganismos pertenecientes a su mismo grupo y hábitat. En este trabajo se realizaron ensayos biológicos capaces de demostrar la inhibición del crecimiento de algunos actinomicetos al invadir el nicho de cepas del mismo grupo establecidas previamente.

INTRODUCCIÓN

La ecología química estudia el papel de los compuestos naturales en las interacciones de microorganismos, plantas y animales y para ello utiliza como herramientas a la química y a la biología (Paul, 1992). Muchos de los compuestos hasta ahora encontrados en la naturaleza, además de presentar una actividad biológica interesante, juegan un papel importante en las complejas interacciones ecológicas y de comportamiento que hay entre los organismos (Paul, 1992). Por su parte, la ecología química marina aporta contribuciones importantes al conocimiento del papel ecológico de los metabolitos secundarios marinos (Jensen y Fenical, 1994).

A diferencia de lo publicado para los organismos terrestres, no existe mucha información acerca de la función de los metabolitos secundarios o productos naturales en el ambiente marino. En años recientes se ha iniciado una evaluación experimental del papel de estos productos naturales en la vida de los organismos que los producen. Estos estudios han generado un avance dentro del área de la ecología de los organismos marinos y del conocimiento de la complejidad de sus comunidades (Paul, 1992).

El interés que se ha generado por estos compuestos en los últimos 20 años, se debe principalmente a la amplia gama de propiedades biológicas y farmacológicas que presentan (Faulkner, 1993). Muchos de estos compuestos se han obtenido de organismos sésiles o de cuerpo suave: esponjas, tunicados, corales suaves, gorgonios y briozoarios (Faulkner, 1993).

Sin embargo, existe una fuente de nuevos compuestos químicos que ha sido poco explotada y que podría considerarse como inagotable. Los microorganismos marinos son un grupo complejo y muy diverso de formas de vida repartidas por todo el océano, incluyendo ambientes extremos como lugares de temperatura, salinidad y presión altas. Por esta razón, estos microorganismos marinos han desarrollado capacidades metabólicas y fisiológicas únicas que, no solo aseguran su supervivencia en hábitats extremos, también muestran un potencial en la producción de nuevos metabolitos imposibles de encontrar en los microorganismos terrestres (Fenical y Jensen, 1994). La diversidad de estos compuestos es sorprendente, sin embargo, es difícil conocer el verdadero potencial biosintético de las bacterias marinas sin antes conocer su biología y su ecología (Jensen y Fenical, 1994).

La ecología química es la herramienta más útil con la que cuentan los microbiólogos para describir las interacciones que se dan entre las bacterias marinas y para descifrar la complejidad de sus comunidades. Esta ciencia permite conocer más acerca de los sistemas biológicos y metabólicos que rodean a los microorganismos, a través de los cuales se genera la diversidad de compuestos.

La comunicación entre bacterias es un tema que ha sido muy discutido y documentado en los últimos años. Los estudios recientes realizados en esta área muestran que las bacterias se comunican entre sí utilizando diversas moléculas químicas que les sirven como palabras (Schauder y Bassler, 2001). Los organismos detectan y responden a la acumulación de dichas moléculas,

llamadas autoinductores. La detección de los autoinductores permite a las bacterias distinguir las diferentes densidades celulares y de esta manera, controlar la expresión de sus genes en respuesta a los cambios que se den en los números celulares. Este proceso, llamado "quorum sensing", permite el control coordinado de la expresión de los genes de toda una comunidad bacteriana (Schauder y Bassler, 2001). Muchos de los comportamientos observados en las bacterias, incluyendo la simbiosis, la virulencia, la producción de antibióticos y la formación de biocapas, están regulados por este proceso (Schauder y Bassler, 2001).

Uno de los comportamientos bacterianos con mayor relevancia para los científicos que se dedican a la búsqueda de nuevos productos naturales es el de la antibiosis.

La producción de compuestos antimicrobianos por bacterias ha sido un tema ampliamente estudiado en los últimos 60 años. La reciente alza en la resistencia hacia los antibióticos comunes que se puede observar hoy en día en las bacterias patógenas, ha logrado que éstos se vuelvan obsoletos (Wiener, 1996).

El papel de los compuestos antimicrobianos en los ecosistemas naturales es uno de los temas más controversiales en el campo de la ecología microbiana. Autores como Fredrickson y Stephanopoulos (1982) y Williams y Vickers (1986), defienden la postura de que estos compuestos son solamente productos de desechos de los microorganismos, mientras que otros proponen que su producción es parte de un comportamiento con un fin específico (Lemos

et al., 1991). Trabajos como el de Rothrock y Gottlieb (1984), muestran las funciones específicas de los compuestos antimicrobianos en ambientes determinados. En este trabajo, se evidencia la inhibición de un hongo patógeno (*Rhizoctonia solani*) al inocularse junto con una bacteria del sedimento (*Streptomyces hygroscopicus var geldanus*). Demain (1995) discute el tema de la producción de antibióticos en sedimentos no estériles y sin adición de nutrientes y asegura que la amplia producción de agentes antimicrobianos, así como el mantenimiento de diversas rutas biosintéticas multigénicas en la naturaleza, indican que los antibióticos tienen funciones dirigidas hacia la supervivencia del organismo que los produce. Foster (1983) encuentra una prueba más de la producción de antibióticos en hábitats naturales al demostrar la presencia de plásmidos resistentes a antibióticos en la mayoría de las bacterias de sedimentos. Williams *et al.* (1989) defienden la postura de que los antibióticos actúan vía receptores específicos (ADN, enzimas sintetizadoras de la pared celular, etc.) en los organismos inhibidos.

Un ejemplo de este tipo de antibióticos es el Agrocina 84 producido por la bacteria *Agrobacterium rhizogenes*. Este antibiótico ataca cepas de agrobacterias patógenas de ciertas plantas (Kerr y Tate, 1984). Wiener (1996) demostró que la producción de antibióticos por *Streptomyces griseus* le daba una gran ventaja al prevenir la invasión por *Bacillus subtilis*.

Existen factores complejos e innumerables que determinan la distribución de las bacterias marinas en el océano. Podríamos considerar al mismo medio acuoso como el principal de ellos ya que las corrientes que en él se presentan, son una forma muy efectiva de dispersar a las bacterias.

La diversidad de las especies bacterianas cambia en la escala milimétrica y aumenta al aumentar también la concentración de materia orgánica particulada en el agua de mar (Long y Azam, 2001). Esta materia orgánica se concentra en distintos ambientes específicos dentro del medio marino, uno de ellos es el de los sedimentos. Los sedimentos marinos contienen debris orgánico que se forma por la descomposición de macro y microorganismos, y presentan también agregados ricos en carbohidratos producidos por los organismos filtradores, como los bivalvos (Fenical y Jensen, 1993 en Bernan, 2001). Éstos invertebrados del bentos producen depósitos de heces y pseudoheces que cubren fragmentos de minerales que forman agregados orgánicos adicionales que a su vez son colonizados por millones de bacterias (Bernan, 2001). Esta gran cantidad de materia orgánica convierte a los sedimentos marinos en un ambiente rico en nutrientes y compuestos orgánicos y, por lo tanto, en un ambiente ideal para encontrar una gran diversidad de especies bacterianas. Entre ellas encontramos al grupo de los actinomicetos, quienes forman una parte integral de cualquier comunidad microbiana balanceada (Goodfellow y Haynes, 1984).

El orden de los Actinomicetales es también uno de los principales grupos taxonómicos productores de antibióticos. La mayoría de los antibióticos de origen microbiano ha sido obtenida de las bacterias terrestres pertenecientes a este orden (Fenical y Jensen, 1993). Este orden se separa en nueve familias distintas 3 de las cuales se encuentran en el océano: Streptomicetaceae, Nocariodaceae y Micromonosporaseae (Ensign, 1992). De igual manera, en otros estudios se muestra que los actinomicetos aislados de los sedimentos marinos son una de las fuentes más prolíficas de metabolitos secundarios bioactivos (Weyland y Heimke, 1988 en Bernan, 2001).

Los actinomicetos son un grupo de bacterias Gram positivas con un alto contenido de guanina y citosina en su ADN (CG = 55 mol%) (Ensign, 1992). No tienen membrana nuclear, en su mayoría son sensibles a las lisozimas y a los antibióticos comunes, sus flagelos y paredes celulares son muy semejantes a los presentes en otras bacterias (Gottlieb, 1973). Su reproducción por lo general es asexual, aunque algunos análisis genéticos dan evidencias de reproducción sexual. Los actinomicetos son normalmente aeróbicos a excepción de los Actinomicetaceae los cuales tienen géneros anaeróbicos y microaeróbicos (Gottlieb, 1973). Son un grupo muy exitoso y ampliamente distribuido ya que tienen un gran número de propiedades que les favorecen en la competencia con otros organismos saprofiticos, lo cual les asegura la supervivencia bajo condiciones ambientales poco favorables (Goodfellow y Haynes, 1984). Habitan por lo general la zona aeróbica de los sedimentos, donde viven como organismos saprofiticos de una gran variedad de sustancias orgánicas y se ha

reportado que existen más de un millón de células por gramo de sedimento (Ensign, 1992). En el aspecto nutricional son versátiles (*i.e.* se alimentan de todo tipo de materia orgánica) , producen diferentes tipos de esporas que les sirven como agentes de dispersión y supervivencia y la mayoría forma un micelio radial el cual les facilita la colonización de sustratos lejanos al centro del crecimiento (Goodfellow y Haynes, 1984).

Por lo general, los actinomicetos forman solamente una pequeña fracción de la comunidad bacteriana de los sedimentos marinos y su aislamiento requiere de pretratamientos y medios selectivos para evitar el crecimiento de otras bacterias presentes en los sedimentos. Por otro lado, se han encontrado poblaciones de hasta 10^5 cel/mL en sedimentos contaminados orgánicamente cercanos a la costa (Goodfellow y Haynes, 1984).

Los actinomicetos contribuyen a la degradación y reciclaje de los compuestos orgánicos más recalcitrantes de la naturaleza, sin embargo, se sabe muy poco acerca de su distribución, crecimiento, actividades, supervivencia y diseminación en ambientes naturales (Goodfellow y Haynes, 1984). Tienen 3 papeles muy importantes en los sedimentos. El primero es el de la descomposición de material orgánico (Gottlieb, 1973). El segundo es el efecto que tienen en la estructura de los sedimentos al unir sus hifas con las partículas arcillosas y dar una consistencia granular muy útil para las cosechas agrícolas. Estos organismos son los responsables del olor a tierra de los sedimentos (Gottlieb, 1973). Por último, los actinomicetos tienen la habilidad de producir antibióticos que afectan el desarrollo de otros microbios (Gottlieb, 1973).

OBJETIVO GENERAL

Determinar la existencia de efectos de inhibición del crecimiento en bacterias de sedimentos marinos del orden Actinomicetales como resultado de las interacciones ecológicas entre ellas.

Objetivos Particulares:

- Realizar un censo aproximado de la población de actinomicetos de sedimentos marinos presentes en una zona delimitada y determinar el requerimiento de agua de mar para su crecimiento.
- Realizar bioensayos para demostrar la inhibición del crecimiento de las cepas bacterianas que invaden el nicho de una cepa de actinomicetos establecida.
- Identificar las cepas que inhiban al mayor número de bacterias en los bioensayos para que puedan ser utilizadas en estudios futuros y así facilitar la búsqueda de nuevos productos naturales marinos con propiedades farmacológicas.

METODOLOGÍA

ÁREA DE ESTUDIO

Las muestras fueron colectadas en la costa de La Jolla, California, EUA los días 6 de Septiembre y 9 de Noviembre del 2001, dentro de un cuadrante delimitado por las siguientes coordenadas (Figura 1):

1. 117° 16.00' W 32° 52.875' N
2. 117° 16.375' W 32° 52.833' N
3. 117° 16.45' W 32° 53.125' N
4. 117° 16.083' W 32° 53.133' N

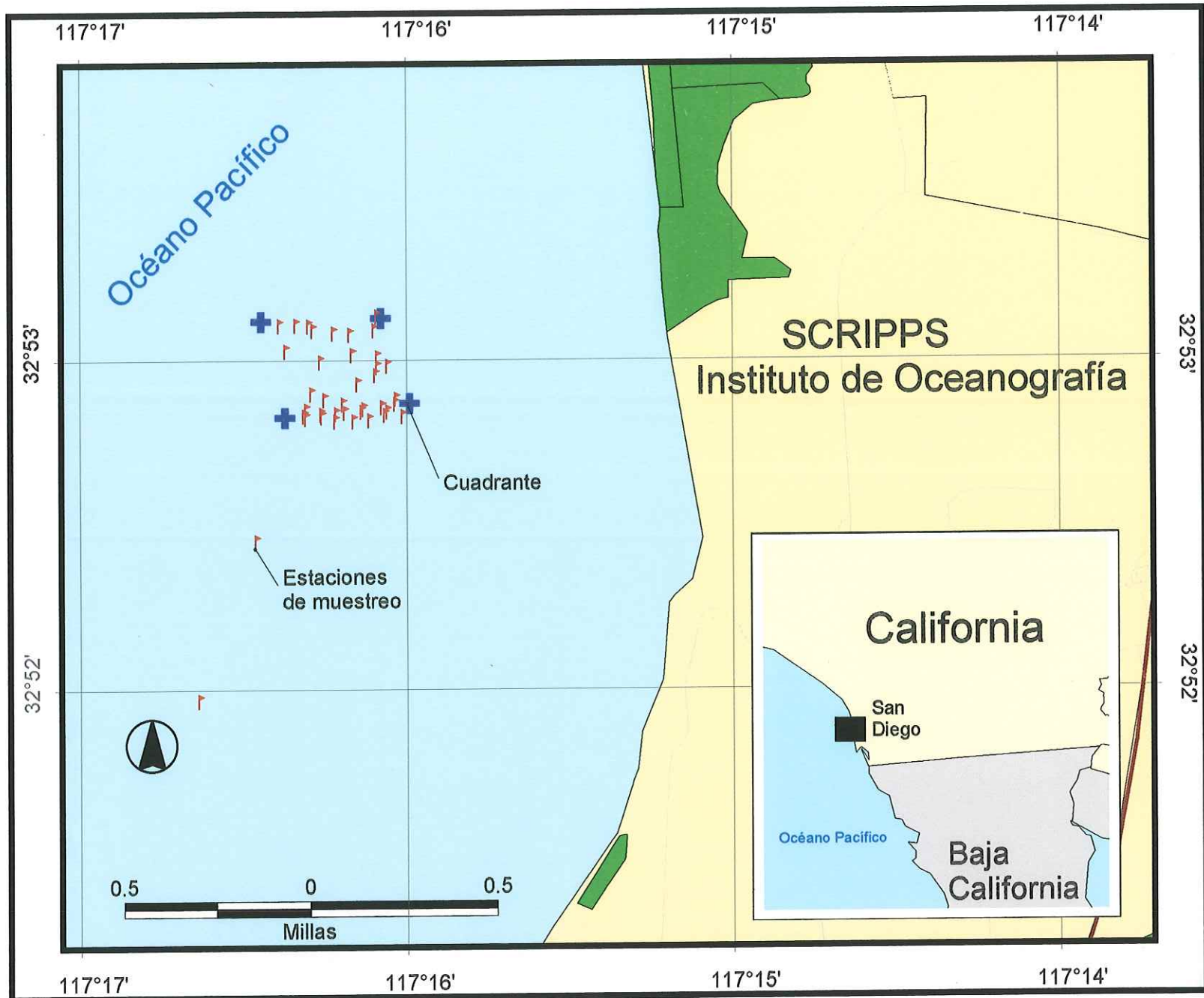


Figura 1. Area de estudio, localizada en la parte norte de la costa de La Jolla, C.A. E.U.A.

Se escogió este cuadrante ya que las diferencias de profundidad en él son muy pequeñas, de esta manera se evitan variaciones en las especies y cantidad de actinomicetos por diferencias de profundidad. Se realizaron 41 muestreos a diferentes profundidades de entre 30 y 53 metros (Anexo I).

Las muestras se tomaron utilizando una draga fabricada por la compañía Khalsico de El Cajon, CA con adaptaciones hechas por técnicos del Instituto Oceanográfico Scripps para muestreos desde embarcaciones pequeñas.

Para medir las profundidades se utilizó un sensor modelo "Fishin' Buddy II Side Finder" fabricado por la compañía Bottom Line.

Todo el material utilizado para tomar las muestras fue limpiado con etanol 100%. Después de sacar la draga, la muestra se tomó utilizando una espátula de metal y procurando que el sedimento fuera de la capa más cercana a la superficie (en los primeros 2 centímetros). Cada muestra fue transferida a tubos de centrífuga estériles de 20 mL, etiquetados previamente y transportadas al laboratorio inmediatamente.

Una vez en el laboratorio las muestras fueron tratadas de tres maneras distintas.

1. ESTAMPADO: Se tomó una sub-muestra de aproximadamente 5 g de sedimento la cual fue transferida a una caja Petri estéril. Todas las muestras se dejaron secar bajo una campana de extracción durante 24 hrs. Se prepararon cajas Petri con diferentes medios de cultivo los cuales se detallan posteriormente en esta sección. Una vez secas las muestras, se estampó el sedimento utilizando esponjas pequeñas, previamente

esterilizadas. La técnica de estampado se realiza tomando sedimento seco con la esponja y presionándola en 9 ó 10 zonas del agar siguiendo una trayectoria circular y sin tomar más muestra para crear un efecto de dilución del sedimento sobre el medio.

2. DILUCIÓN: En viales con 4 mL de agua de mar estéril se adicionó la cantidad de sedimento húmedo suficiente para desplazar el agua lo equivalente a 1 mL, y obtener una dilución de 1 mL de sedimento en 5 mL de agua de mar. De esta dilución, se tomaron 0.45 mL y se pasaron al siguiente vial el cual contenía 4.5 mL de agua de mar. Después de agitar el vial, de éste se tomaron 0.45 mL y se pusieron en el siguiente vial que contenía otros 4.5 mL de agua de mar, generando sucesivamente diluciones de 1:5, 1:50 y 1:500, respectivamente. De las diluciones 1:50 y 1:500 se tomaron alícuotas de 45 µl de cada vial para inocular las cajas Petri con cada uno de los cuatro medios de cultivo. Este método se utilizó solamente para las muestras de las estaciones 17 a la 41.

3. ESTRÉS POR CALOR (Heat shock): Este tratamiento se aplicó en la dilución (1:5) que se realizó para todas las muestras. Los viales se colocaron en una gradilla de plástico y se mantuvieron a 55° C durante 6 min. Se utilizaron 45 µl para inocular cajas Petri con cada uno de los medios.

Las técnicas de estampado y tratamiento por calor se realizaron ya que cada una de ellas permite el crecimiento de diferentes tipos de actinomicetos (Jensen, comunicación personal, 2002):

Para el aislamiento de los actinomicetos se utilizaron los siguientes medios:

A1

10 g almidón

4 g extracto de levadura

2 g bactopectona

16-18 g agar bacteriológico

1000 mL de agua de mar

SWA

16-18 g agar bacteriológico

1000 mL de agua de mar

A cada medio se le agregó 1 mL de ciclohexamida (antifungal)[100 $\mu\text{g}/\text{mL}$] además, se prepararon cajas Petri con ciclohexamida [100 $\mu\text{g}/\text{mL}$] y 1mL de rifampicina (antibiótico) [5 $\mu\text{g}/\text{mL}$] (concentraciones finales).

La rifampicina se utilizó con el fin de evitar el crecimiento de las bacterias Gram negativas y positivas que abundan en los sedimentos y que tienen tasas de crecimiento mayores a las de los actinomicetos. También se agregó para evitar el crecimiento de los actinomicetos más comunes (Streptomicetos) y

permitir el crecimiento de otros organismos menos estudiados. La ciclohexamida se utilizó como antifúngico para evitar la contaminación de los medios con hongos presentes en las muestras. Se prepararon también medios con solo ciclohexamida para comparar si el número de actinomicetos perdidos por la adición de rifampicina era considerable. De esta manera se contó con 4 medios distintos:

A1 + ciclohexamida (**A1+C**)

A1 + ciclohexamida + rifampicina (**A1+C/R**)

SWA + ciclohexamida (**SWA+C**)

SWA + ciclohexamida + rifampicina (**SWA+C/R**)

Todas las cajas fueron incubadas a 24° C hasta que fue posible ver a simple vista las colonias formadas (entre 1 y 2 semanas). Una vez diferenciadas de las otras bacterias, la mayoría de los actinomicetos presentes en cada caja (>80%), fueron reinoculados en cajas con medio A1+ciclohexamida para su purificación.

Para obtener las cepas puras se utilizó la técnica de estriado en placa. Todas las cepas aisladas se pusieron dentro de la colección de microorganismos del laboratorio Kaplan del Instituto Oceanográfico Scripps, La Jolla, CA, donde se utiliza como clave de identificación la leyenda CN (número en la colección) + letra del alfabeto (A-Z) (a cada letra le corresponden 999 organismos diferentes) + número del organismo. Las cepas se mantuvieron congeladas por criogénesis. La técnica consiste en poner a los organismos a crecer en 10 mL de un medio

líquido que favorezca su crecimiento (en este caso A1) y después añadir 2 mL de glicerol 50% (concentración final de 10%) para su preservación a un temperatura de -80° F.

PRUEBAS DE CRECIMIENTO EN AGUA DE MAR Y AGUA DESIONIZADA

Se tomó una colonia de cada cepa pura aislada y se sembró esparciéndola con un asa estéril, en dos cajas Petri de 5 cm de diámetro con medio A1. En una de las cajas el medio fue preparado utilizando agua de mar y en la otra utilizando agua desionizada. Después de 2 a 3 semanas de incubación se compararon las diferencias en el crecimiento aparente de las cepas en ambas cajas, basándose en la densidad de colonias observable en las cajas.

IDENTIFICACIÓN GRAM

Las pruebas de identificación Gram se hicieron utilizando la técnica de KOH sin tinción de Ryu (Powers, 1995).

BIOENSAYOS

Se aislaron también 13 bacterias Gram positivas y Gram negativas, tomadas al azar de diferentes muestras, las cuales fueron sembradas en cajas Petri y se observó su sensibilidad a antibióticos utilizando sensidiscos de gentomicina (10 µg/mL marca Difco) como control positivo. Se utilizaron 45 µl de un cultivo líquido de cada bacteria con aproximadamente 10^6 cel/mL para inocular cada caja. De las 13 bacterias se seleccionaron solamente aquellas que fueron

inhibidas por el antibiótico y que presentaron un crecimiento uniforme sobre el agar (2 cepas Gram positivas).

Las cepas puras de actinomicetos se reinocularon en cajas Petri cuadradas con 30 mL de medio A1 de la siguiente manera:

Se tomó una muestra pequeña de cada cepa utilizando un palillo de madera estéril y se picó sobre el agar para sembrarla. Se sembraron 12 cepas (con una réplica) por caja y entre 5 y 6 réplicas de cada caja. Las cajas fueron selladas con parafilm e incubadas a 24° C entre 1 y 2 semanas hasta que las colonias de microorganismos podían observarse a simple vista.

Después de probar varias técnicas de sembrado e inoculación de los organismos sobre el agar inoculado, se optó por preparar cajas Petri cuadradas con una capa de agar más delgada (10-15 mL agar/caja) que más adelante se utilizó como tapa para cubrir las cepas de actinomicetos sembradas en las otras cajas. Esta segunda capa de agar sirvió como base para sembrar diferentes cepas.

Las cepas seleccionadas para los bioensayos fueron enjuagadas con 4 mL de agua de mar estéril y colectadas en tubos de centrifuga estériles de 10 mL. Se agregó 1 mL de glicerol 50% a cada uno de los tubos para preservarlas criogénicamente.

Para inocular las 2 cepas de bacterias Gram positivas seleccionadas sobre la capa de agar se utilizaron alícuotas de 45 µl de cada cultivo líquido que no

tuviera más de 24 hrs, es decir, con aproximadamente 10^6 cel/mL (Tracy Mincer, comunicación personal, 2002¹).

Para inocular las esporas de los actinomicetos seleccionados sobre la capa de agar, se utilizó un aplicador con punta de algodón estéril el cual se sumergió en el tubo con agua de mar y esporas y luego se esparció sobre el agar. Esta técnica utilizó alrededor de 0.5 mL de agua de mar cada vez que se sumergía el aplicador.

Las cajas inoculadas se sellaron con parafilm y fueron incubadas a 24° C. Las cajas inoculadas con las bacterias Gram positivas se revisaron a las 24, 48 y 72 horas para observar su crecimiento. Las cajas sembradas con esporas de actinomicetos se revisaron a los 3, 5, 7 y 12 días. Se midieron los halos de inhibición en las cajas en las que se observaba algún efecto positivo. Todas las mediciones se hicieron a los 5 ó 6 días de incubación.

RESULTADOS

En total se aislaron 370 cepas de actinomicetos de las 41 estaciones muestreadas. En la Figura 2 se presenta la distribución (frecuencia de ocurrencia) que tuvieron dentro del cuadrante determinado. En ella se observa que la estación número 5 (32° 53.107' N; 117° 16.386' W) presentó el mayor número de organismos, con un total de 42. Le siguen la estación número 9 con un total de 24 organismos y las estaciones 3 y 4 ambas con 22. La única estación en la cual no se presentó ningún organismo fue la 31. En todas las demás estaciones se aisló al menos un actinomiceto por muestra. El intervalo

¹ Tracy Mincer, estudiante de doctorado del Instituto Oceanográfico de Scripps

de profundidad, dentro del cuadrante muestreado, en el cual se encontró el mayor número de actinomicetos fue entre los 46 y 51 metros.

Los 370 actinomicetos aislados se separaron en 7 grupos considerando su morfología y color:

1. Cepas anaranjadas
2. Cepas con esporas blancas y base oscura
3. Cepas con esporas blancas y base clara
4. Cepas con esporas grises
5. Cepas beige rugosas
6. Cepas beige redondas
7. Cepas raras (morfología y colores llamativos)

Del total de cepas aisladas se hizo una submuestra que representara alrededor del 25% de los microorganismos encontrados. Para esto, se seleccionaron 104 organismos (28%) con representantes de cada grupo: 23 del primero grupo, 4 del segundo grupo, 27 del tercer grupo, 6 del cuarto grupo, 17 del quinto grupo, 12 del sexto grupo y 15 del séptimo grupo (Tabla I). La selección de cepas de cada grupo se hizo dependiendo de la peculiaridad de los actinomicetos en cada uno de los grupos, es decir, se seleccionaron las cepas que morfológicamente se repetían menos en cada grupo.

Las dos cepas Gram positivas que se seleccionaron para ser utilizadas en los bioensayos fueron aisladas de la estación número 5. Para estos bioensayos

también se seleccionaron 16 cepas con esporas que mostraron algún tipo de inhibición en bioensayos preeliminares (Tabla I).

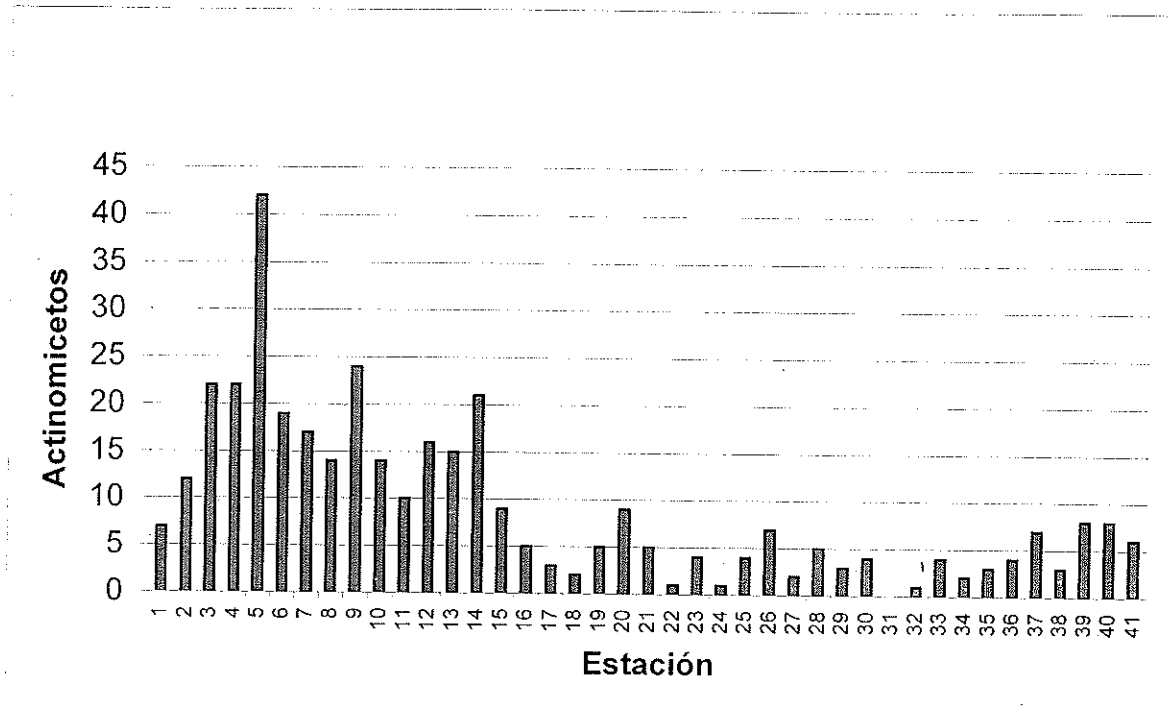


Figura 2. Número de cepas de actinomicetos aisladas por estación.

Tabla I. División por grupos de las cepas de actinomicetos utilizadas en los bioensayos. En negritas se indican aquellas con esporas utilizadas en los bioensayos.

Grupo 1 Anaranjadas	Grupo 2 Esporas blancas y base oscura	Grupo 3 Esporas blancas y base clara	Grupo 4 Esporas grises	Grupo 5 Beige rugosas	Grupo 6 Beige redondas	Grupo 7 Raras
CNQ050	CNQ156	CNQ041	CNQ147	CNQ140	CNQ039	CNQ032
CNQ148	CNQ243	CNQ043	CNQ178	CNQ142	CNQ047	CNQ044
CNQ308	CNQ481	CNQ045	CNQ453	CNQ177	CNQ164	CNQ159
CNQ310	CNQ489	CNQ046	CNQ511	CNQ183	CNQ175	CNQ181
CNQ313		CNQ052	CNQ621	CNQ236	CNQ235	CNQ266
CNQ332		CNQ146		CNQ237	CNQ246	CNQ267
CNQ335		CNQ151		CNQ259	CNQ252	CNQ306
CNQ402		CNQ153		CNQ262	CNQ304	CNQ374
CNQ419		CNQ166		CNQ314	CNQ451	CNQ384
CNQ420		CNQ174		CNQ328	CNQ458	CNQ509
CNQ421		CNQ239		CNQ390	CNQ463	CNQ513
CNQ424		CNQ242		CNQ441	CNQ651	CNQ521
CNQ469		CNQ250		CNQ500		CNQ525
CNQ472		CNQ253		CNQ623		CNQ655
CNQ479		CNQ261		CNQ653		CNQ668
CNQ501		CNQ299		CNQ664		
CNQ516		CNQ325		CNQ675		
CNQ634		CNQ327				
CNQ639		CNQ370				
CNQ641		CNQ372				
CNQ644		CNQ376				
CNQ657		CNQ386				
CNQ663		CNQ392				
		CNQ397				
		CNQ410				
		CNQ460				
		CNQ490				
		CNQ617				

Para calcular el número aproximado de actinomicetos presentes por muestra, se utilizó el método de dilución y conteo de unidades formadoras de colonias (UFC). Los porcentajes relativos de actinomicetos con respecto al número total de bacterias que se encontraron en las estaciones fueron: 23% para la estación 21, 25% para la estación 23, 11% para la estación 24, 17% para

la estación 25, 9% para la estación 34, 4% para la estación 35, 4% para la estación 40 y 4% para la estación 41 (Tabla II).

Como se puede observar, algunas de las estaciones no presentaron actinomicetos al utilizar esta técnica. Ésto se debe a que en la técnica de dilución no se le da un pretratamiento a la muestra, lo cual permite el crecimiento de las bacterias Gram negativas quienes impiden el crecimiento de los actinomicetos. Para evitar estas subestimaciones, en este tipo de estudios es mejor utilizar las técnicas moleculares de secuenciación de genes ribosomales que se utilizan para análisis filogenéticos (Weisburg *et al.*, 1991 en Long y Azam, 2001).

En la Figura 3 se muestra la cantidad de actinomicetos aislados con los diferentes medios de cultivo utilizados. En ella se puede observar que con el medio A1 + R/C se aisló el mayor número de actinomicetos (132), mientras que con el medio A1 +C solamente se aislaron 19 actinomicetos. Con los medios SWA + C y SWA + R/C se aislaron 115 y 104 actinomicetos, respectivamente.

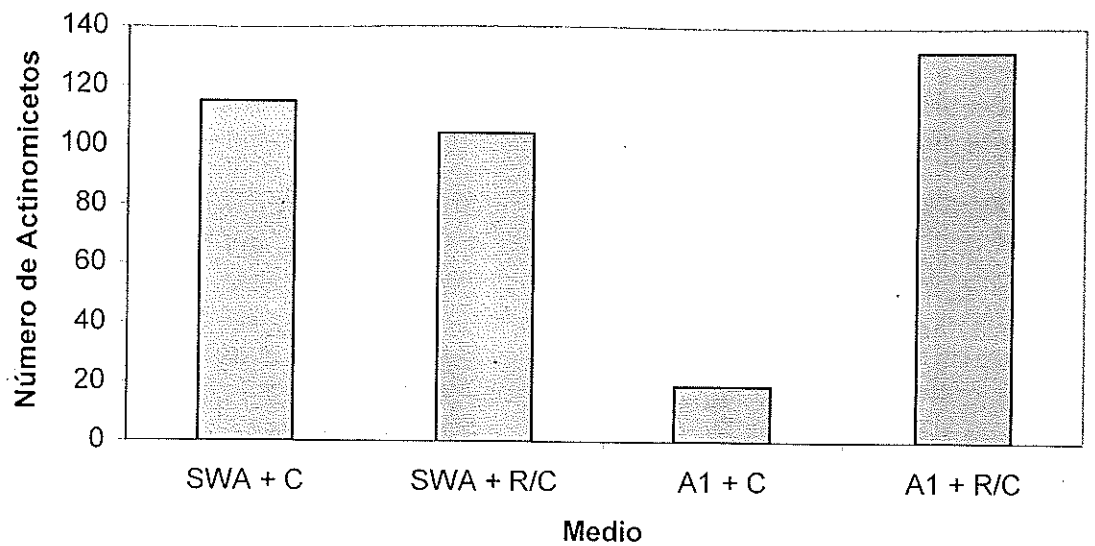


Figura 3. Crecimiento de cepas de actinomicetos en diferentes medios de cultivo. SWA = medio preparado con agua de mar y agar solamente . A1= medio preparado con agua de mar y nutrientes. C = ciclohexamida R= rifampacina

Tabla II. Porcentaje relativo de actinomicetos por muestra.

Estación	UFC/mL promedio	UFC de actinomicetos/mL	% Relativo
17	35833	-	
18	29630	-	
19	12963	-	
20	213333	-	
21	4722	1111	23
22	42777	-	
23	13333	3333	25
24	100000	11111	11
25	6667	1111	17
26	1111	-	
27	16666	-	
28	4444	-	
29	22222	-	
30	8889	-	
31	68333	-	
32	66667	-	
33	2222	-	
34	12222	1111	9
35	27777	1111	4
36	11111	-	
37	Contam	-	
38	8333	-	
39	19444	-	
40	25926	1111	4
41	57777	2222	4

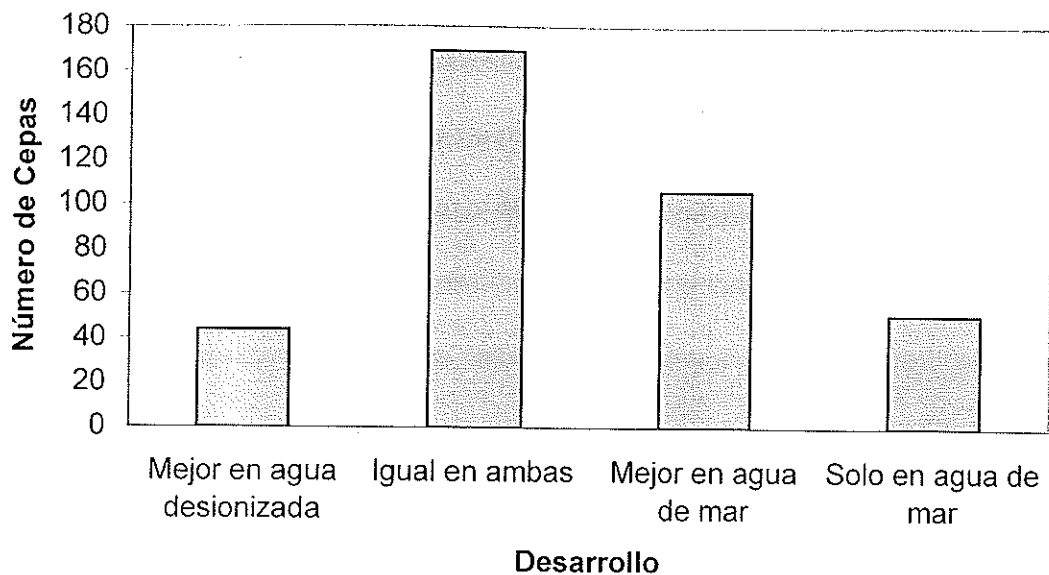


Figura 4. Requerimiento de agua de mar en el crecimiento de las cepas de actinomicetos aisladas.

En la Figura 4 se presenta una relación del efecto del agua de mar en el crecimiento de los actinomicetos aislados. Los organismos se dividieron en cuatro grupos distintos según el crecimiento aparente (basado en la densidad de las colonias) observado en las cajas Petri:

1. Actinomicetos que aparentemente crecen mejor en agua desionizada
2. Actinomicetos que aparentemente crecen igual en agua de mar y agua desionizada
3. Actinomicetos que aparentemente crecen mejor en agua de mar
4. Actinomicetos que sólo crecen en agua de mar

Se encontraron 44 actinomicetos (12%) pertenecientes al primer grupo, 169 (45%) pertenecientes al segundo grupo, 106 (28%) pertenecientes al tercer grupo y 51 (14%) pertenecientes al cuarto grupo.

Para comprobar la inhibición generada por interacciones ecológicas, de las 104 cepas pertenecientes a la submuestra de actinomicetos aislados, se tomaron 45 cepas (las que no presentaban esporas) que se usaron en los bioensayos contra las 16 cepas que mostraron actividad en bioensayos preliminares (Tabla I). De estas 720 pruebas solamente 35 resultados fueron positivos (Tabla IV). Son solamente 35 ya que se omitieron 3 cepas incluidas en la tabla que se utilizaron en bioensayos posteriores (CNQ153, CNQ386 y CNQ490). En los resultados Las 5 cepas que se probaron contra todos los microorganismos de la lista fueron: CNQ156, CNQ259, CNQ325, CNQ372 y CNQ410.

Las cepas que presentaron mayor bioactividad, es decir, que inhibieron el crecimiento del mayor número de cepas, fueron: la cepa CNQ181 obtenida de una profundidad de 47 metros, la cual inhibió a 5 cepas distintas; la cepa CNQ402 obtenida de una profundidad de 35 metros y que inhibió a 4 cepas distintas y las cepas CNQ335, CNQ521, CNQ655, CNQ668 y CNQ490 que inhiben a 3 cepas distintas y fueron obtenidas de profundidades de 46, 43, 33, 42 y 40 metros, respectivamente (Tabla III). Las cepas que generaron los halos de inhibición más grandes fueron: CNQ490 y CNQ521 con inhibiciones de hasta 14 mm; CNQ153 con inhibiciones de hasta 13 mm; CNQ655 con inhibiciones de hasta 12.2 mm; CNQ181 y CNQ397 con inhibiciones de 12 mm (Tabla IV).

Por otra parte, de las 16 cepas con esporas utilizadas, las 2 cepas que fueron más sensibles (*i.e.* que fueron inhibidas el mayor número de veces),

fueron las cepas CNQ325 y CNQ372 inhibidas por 6 cepas cada una. Las dos cepas menos sensibles fueron CNQ178 y CNQ156 que fueron inhibidas solamente dos veces (Tabla IV).

Tabla III. Actinomicetos que mostraron actividad antimicrobiana en los bioensayos.

Cepa activa	Cepas inhibidas	Estación	Profundidad (m)	Crecimiento
CNQ050	CNQ325	15	37	Igual en ambas
CNQ140	CNQ410	5	51	Solo en agua de mar
CNQ153	CNQ372; CNQ259	6	49	Igual en ambas
CNQ159	CNQ372; CNQ259	5	51	Solo en agua de mar
CNQ181	2Gram+; CNQ250; CNQ325; CNQ386	5	51	Solo en agua de mar
CNQ183	CNQ259	5	51	Mejor en agua de mar
CNQ304	CNQ259	7	47	Solo en agua de mar
CNQ310	CNQ372	4	51	Nd
CNQ335	CNQ386; 2Gram+	3	46	Nd
CNQ386	CNQ410	10	40	Solo en agua de mar
CNQ397	2Gram+			
CNQ402	CNQ178; CNQ386; 2Gram+	11	35	Igual en ambas
CNQ472	CNQ386	2	40	Mejor en agua de mar
CNQ490	CNQ156; CNQ325; CNQ372	10	40	Solo en agua de mar
CNQ509	CNQ410	36	44	Solo en agua de mar
CNQ521	CNQ250; CNQ325; CNQ372	20	43	Mejor en agua de mar
CNQ525	CNQ325	40	152	Solo en agua de mar
CNQ655	CNQ156; CNQ250; CNQ325	17	33	Mejor en agua de mar
CNQ664	CNQ250; CNQ325	17	33	Solo en agua de mar
CNQ668	CNQ178; 2Gram+	28	42	Mejor en agua de mar

Nd= No determinado.

Tabla IV. Inhibición de crecimiento de cepas de actinomicetos con esporas observada en los bioensayos. Mediciones hechas a los 5 ó 6 días de incubación.

CEPA ACTIVA	RADIO DEL HALO DE INHIBICIÓN	CEPA INHIBIDA
CNQ050	9 mm	CNQ325
CNQ140	8 mm	CNQ410
CNQ153	2 mm	CNQ372
CNQ153	13 mm	CNQ259
CNQ159	5 mm	CNQ372
CNQ159	7 mm	CNQ259
CNQ181	7.5 mm	Gram + (1)
CNQ181	6.7 mm	Gram + (2)
CNQ181	8.5 mm	CNQ250
CNQ181	5 mm	CNQ325
CNQ181	12 mm	CNQ386
CNQ183	8 mm	CNQ259
CNQ304	5 mm	CNQ259
CNQ310	3 mm	CNQ372
CNQ335	4 mm	Gram + (1)
CNQ335	9 mm	Gram + (2)
CNQ335	4 mm	CNQ386
CNQ386	4.5 mm	CNQ410
CNQ397	12 mm	Gram + (1)
CNQ397	10 mm	Gram + (2)
CNQ402	4 mm	Gram + (2)
CNQ402	5 mm	Gram + (1)
CNQ402	5 mm	CNQ386
CNQ402	10 mm	CNQ178
CNQ472	7 mm	CNQ386
CNQ490	8 mm	CNQ372
CNQ490	12 mm	CNQ156
CNQ490	14 mm	CNQ325
CNQ509	8.5 mm	CNQ410
CNQ521	7.5 mm	CNQ372
CNQ521	14 mm	CNQ325
CNQ521	14 mm	CNQ250
CNQ525	3.7 mm	CNQ325
CNQ655	9.3 mm	CNQ325
CNQ655	12.2 mm	CNQ250
CNQ655	7 mm	CNQ156
CNQ664	7 mm	CNQ325
CNQ664	8 mm	CNQ250
CNQ668	3.5 mm	Gram + (1)
CNQ668	3.5 mm	Gram + (2)
CNQ668	3 mm	CNQ178

Uno de los resultados inesperados obtenidos durante este estudio fue la estimulación del crecimiento y de la esporulación de algunas bacterias, así como la inhibición de la esporulación de algunas otras a causa de la presencia de los actinomicetos establecidos en el agar inferior. En los 720 bioensayos realizados se encontraron 7 cepas que mostraron un aumento en su esporulación debido a la presencia de otros organismos sembrados bajo ellas, 4 cepas que mostraron una estimulación en su crecimiento y 1 cepa que mostró una inhibición en su esporulación (Tabla V).

Tabla V. Cepas que estimulan el crecimiento y estimulan o detienen la esporulación.

Cepa activa	Cepa afectada	Estimula o Detiene
CNQ050	CNQ375	Ee
CNQ151	CNQ250	Ee
CNQ151	CNQ372	Ee
CNQ156	CNQ043	De
CNQ181	CNQ372	Ee
CNQ181	CNQ156	Ee
CNQ236	Gram+	Ee
CNQ243	CNQ374	Ec
CNQ262	CNQ372	Ee
CNQ262	CNQ156	Ee
CNQ266	CNQ374	Ee
CNQ308	CNQ373	Ee
CNQ314	CNQ372	Ee
CNQ384	CNQ372	Ee
CNQ419	CNQ372	Ee
CNQ419	CNQ156	Ee
CNQ419	CNQ039	Ec
CNQ421	CNQ372	Ee
CNQ421	CNQ156	Ee
CNQ460	CNQ286	Ec
CNQ472	CNQ372	Ee
CNQ472	CNQ039	Ec
CNQ479	CNQ372	Ee
CNQ481	CNQ372	Ee
CNQ617	CNQ043	De
CNQ621	CNQ043	De
CNQ639	CNQ376	Ee
CNQ639	CNQ286	Ec
CNQ641	CNQ372	Ee
CNQ641	CNQ156	Ee
CNQ657	CNQ156	Ee
CNQ663	CNQ372	Ee

Ee= Estimula esporulación

De= Detiene esporulación

Ec= Estimula crecimiento

DISCUSIÓN

Distribución y Crecimiento de los Actinomicetos Aislados

En la búsqueda y descubrimiento de productos naturales marinos, es muy útil conocer la distribución general de las bacterias y los factores que afectan dicha distribución (Jensen y Fenical, 1994). Los principales factores que influyeron en la cantidad de actinomicetos aislados en cada muestra fueron: (1) el número total de cepas de bacterias en cada muestra que pudo ser cultivado en los medios seleccionados, ya que solo alrededor del 1% de la población total de bacterias presentes en una muestra son cultivables (Austin, 1988). (2) El tipo de bacterias Gram positivas y negativas que fueron resistentes al antibiótico y al fungicida utilizados en los medios, ya que si las bacterias Gram positivas y negativas presentes en la muestra son resistentes a la concentración del antibiótico utilizado, habrá un mayor número de este tipo de bacterias desplazando a los actinomicetos e impidiendo su crecimiento. (3) Los tratamientos por calor y estampado que se utilizaron. Los tratamientos se utilizaron como técnicas selectivas para el aislamiento de actinomicetos, por lo tanto, solamente se pudieron aislar aquellos que resistieron ambos tratamientos y además fueron cultivables.

La Figura 2 muestra que la distribución de los actinomicetos no sigue ningún patrón determinado. El número de microorganismos aislados disminuyó considerablemente en el segundo muestreo (estaciones 17-41), sin embargo, esto se debió más a cuestiones metodológicas en el aislamiento (crecimiento

excesivo de bacterias Gram positivas que consumieron todo el agar), que por algún patrón que siguieran los organismos en el cuadrante.

El hecho de que en este trabajo también se aislaron organismos de las muestras provenientes de profundidades de 150 y 300 metros es prueba de la existencia de actinomicetos puramente marinos, ya que es muy poco probable que estos organismos hayan sido arrastrados desde la costa como lo propusiera Weyland (1981).

Al comparar la concentración total de bacterias presentes en los sedimentos marinos (10^7 - 10^9 bacterias/mL) (Austin, 1988), con la concentración de actinomicetos (10^1 - 10^2 actinomicetos/mL) (Weyland, 1981), se observa que la diferencia es de hasta 7 órdenes de magnitud. Para evitar que los otros grupos de bacterias colonizaran todo el medio antes de que los actinomicetos pudieran desarrollarse, fue necesario utilizar métodos de aislamiento selectivos tales como el tratamiento por calor y el uso de antibióticos (El-Nakeeb y Lechevalier, 1962; Kuster y Williams, 1964; Goodfellow y Williams, 1986). Este problema de diferencia en las tasas de crecimiento fue evidenciado en muestras como la proveniente de la estación 31 en la cual no se aisló ningún actinomiceto y en otras como las estaciones 22, 24 y 32 en las que se aisló solamente un actinomiceto (Figura 2). En ellas fue notable el número de bacterias Gram positivas y negativas que lograron resistir el antibiótico. El desmesurado crecimiento de dichas bacterias impidió el crecimiento de los actinomicetos ya que estos últimos tienen tasas de crecimiento menores.

El promedio de organismos obtenidos fue de 3 actinomicetos por aproximadamente 1 mL de sedimento húmedo. A pesar de que éste es un número menor al obtenido por Weyland (1981; 16 y 760 actinomicetos por mL de sedimento), la diferencia es de sólo dos órdenes de magnitud lo cual no es significativamente distinto en microorganismos con tasas de crecimiento exponenciales.

En la Tabla III se muestra el número de unidades formadoras de colonias (UFC) para los actinomicetos de cada muestra. Estos datos concuerdan con los presentados por Weyland (1981), quien encontró un porcentaje de entre 0.06% y 13.8% de actinomicetos en relación al número total de bacterias presentes. Sin embargo, el método de dilución no se consideró útil para la enumeración de actinomicetos en las muestras, ya que de las 25 muestras utilizadas para este estudio (segundo muestreo), solamente 8 presentaron actinomicetos. Ésto significaría que no hubo actinomicetos presentes en las 13 muestras restantes, lo cual no es cierto ya que con los métodos de estampado y tratamiento de calor se encontraron actinomicetos presentes en casi todas las muestras. Hay que considerar que el método de dilución es diferente a los utilizados para el aislamiento de los actinomicetos ya que, para estos últimos, se hicieron pretratamientos a la muestra, por lo tanto, no es correcto comparar ambos resultados. Sin embargo, los resultados obtenidos con el método de dilución muestran que la presencia de los actinomicetos en las muestras se enmascara debido al crecimiento de otros microorganismos. Los actinomicetos no tienen oportunidad de desarrollarse cuando están en competencia contra bacterias que

tienen una tasa de crecimiento mayor a la suya, por lo tanto, el método de dilución no es recomendable.

Crecimiento en Diversos Medios de Cultivo

Los resultados demuestran que el medio más útil para aislar actinomicetos en este estudio fue el A1 con rifampicina y ciclohexamida (A1+R/C), ya que 132 de los 370 organismos aislados se obtuvieron con él (Figura 3). Sin embargo, los medios SWA con ciclohexamida y SWA con rifampicina y ciclohexamida presentaron también un número considerablemente alto de organismos (115 y 104, respectivamente). Evidentemente, el uso de la rifampicina no evitó el crecimiento de muchos actinomicetos. Lo que sí logro, fue que se evitara el crecimiento de la mayoría de las bacterias Gram positivas y negativas presentes en la muestra. Al comparar los actinomicetos que se aislaron a partir de los diferentes medios (alto contenido de nutrientes y bajo contenido de nutrientes; A1 vs SWA), fueron notables las diferencias morfológicas entre ellos, es decir, con el medio sin nutrientes se logra un medio más selectivo, ya que la mayoría de los actinomicetos más raros (sin esporas blancas o grises y de colores llamativos o productores de pigmentos), se aislaron de los medios SWA con rifampicina y ciclohexamida y SWA con ciclohexamida. Este resultado muestra que el medio A1 + R/C es el mejor para aislar los tipos más comunes de actinomicetos, sobre todo los que tienen esporas grises y blancas. Sin embargo, si se quieren obtener cepas "raras" de colores llamativos (amarillo, anaranjado, morado, etc.) y con producción de

pigmentos, es mejor utilizar el medio SWA con adición de antibióticos. Es decir, las cepas morfológicamente más raras están adaptadas a sobrevivir con una menor cantidad de nutrientes.

Es importante hablar del crecimiento observado en cada medio. Por lo general, los actinomicetos empezaron a ser colonias visibles después de una y media o dos semanas de incubación a 24° C. Las cepas con tasas de crecimiento más rápidas fueron también las más comunes: cepas con esporas grises y blancas y las cepas beige rugosas.

Las cepas que tardaron un poco más en crecer fueron las de morfología más particular: cepas amarillas, verdes, anaranjadas, moradas, rojas y otras, probablemente por haber crecido en medios con pocos nutrientes.

Requerimiento de Agua de Mar para el Crecimiento (bacterias marinas vs. bacterias terrestres).

El aislar actinomicetos utilizando medios de cultivo preparados con agua de mar no asegura que dichos organismos sean completamente marinos. El hecho de que los actinomicetos producen esporas que pueden ser arrastradas desde la costa hace aún más difícil la tarea de comprobar la naturaleza marina de dichos organismos.

Los primeros estudios en microbiología marina distinguen a las bacterias marinas de las terrestres basándose en el requerimiento de agua de mar para su crecimiento (Zobell, 1944). Los estudios más recientes se enfocan en el papel fisiológico del sodio. Para muchas bacterias marinas, el transporte de la mayoría

de los solutos hacia adentro de la célula depende del sodio (Berthelet y MacLeod, 1991). Oh *et al.* (1991) han demostrado que este requerimiento en las bacterias marinas se da debido a la presencia de un flujo de sodio dependiente de la respiración y sugieren que la presencia de este flujo, llevado a cabo por transporte de electrones, puede ser considerado como un criterio en la definición de bacterias marinas.

La existencia de actinomicetos propiamente marinos aún es cuestionable, sin embargo, se han dado algunos avances en esta área de estudio. Jensen *et al.* (1991) observaron que, el grado de requerimiento de sodio en el crecimiento de los actinomicetos de origen marino varía dependiendo del grupo taxonómico que se estudia. A mayor distancia de la costa aumenta el número de actinoplanetos (por lo general marinos) y disminuye el número de streptomicetos (en su mayoría terrestres con adaptaciones al medio marino) (Jensen *et al.*, 1991).

Los resultados muestran que la mayoría de los actinomicetos aislados están adaptados a condiciones salinas, ya que pueden crecer en medios de cultivo con y sin agua de mar (45%), o crecen mejor en medio de cultivo con agua de mar (28%) (Figura 4). Solamente hay un 12% de actinomicetos que crecen mejor en medio de cultivo con agua desionizada. Un 14% crece solamente en medio de cultivo con agua de mar, lo cual indica la presencia de actinomicetos propiamente marinos y los convierte en organismos interesantes para estudios futuros (Figura 4). Es importante hacer este tipo de distinciones fisiológicas para poder enfocarse al grupo de mayor interés para el investigador.

A pesar de que el sólo requerimiento de sodio no garantiza el descubrimiento de nuevos productos naturales, esta característica fisiológica puede considerarse como una base distintiva para comenzar la búsqueda de actinomicetos con rutas biosintéticas únicas y distintas a las de sus contrapartes terrestres ya que estos organismos presentarían adaptaciones a diferentes factores de comunicación y defensa debido al ambiente en el que se encuentran.

Bioensayos de Inhibición de Crecimiento

De acuerdo a Rice *et al.* (1999), las bacterias han desarrollado adaptaciones que les ayudan a detectar y a responder a características y situaciones que ocurren dentro de su ambiente. Algunos de los estímulos clásicos que han sido ampliamente estudiados incluyen cambios en la temperatura, disponibilidad de nutrientes, presión hidrostática, oxígeno y pH. La habilidad de responder o interactuar con el ambiente local determina el éxito o fracaso de un organismo. Entre estas respuestas destaca la capacidad de los microorganismos para responder a la presencia de otros organismos. Es esencial para un organismo el detectar los niveles de su propia población, así como la de otros miembros de su comunidad para poder tomar las acciones necesarias (Rice *et al.*, 1999).

Para evaluar las acciones que toman los actinomicetos que habitan en sedimentos marinos, al tener como presión ecológica la invasión de su nicho por otro organismo, se realizaron pruebas de bioactividad en las cuales los actinomicetos se vieran enfrentados a otros microorganismos. Las pruebas de

bioactividad se realizaron con una submuestra de 104 actinomicetos (Tabla I). La Tabla III muestra los resultados de estas pruebas.

No fue posible realizar análisis cuantitativos para poder observar el grado de interacciones antibacterianas presentes en la zona de estudio. Sin embargo, al extrapolar el número de actinomicetos activos en la submuestra tomada, es decir, al multiplicar 20×3.55 que sería la proporción entre 370 y 104 ($370 / 104 = 3.55$), se tiene que al menos 71 actinomicetos presentes en el cuadrante presentan cierto tipo de actividad inhibitoria probablemente debida a la producción de compuestos antibacterianos. Esto indica que dentro de un cuadrante de 0.2 km^2 al menos un 19% de los actinomicetos presentes (71 de 370) utilizan estrategias de interacción química para inhibir el crecimiento de sus competidores. Si se quiere examinar el porcentaje de actividad que hubo referente a las pruebas realizadas, sabemos que se usaron 45 organismos contra las 16 cepas con esporas, es decir, se realizaron un total de 720 pruebas en las cuales solamente 35 resultados fueron positivos (Tabla IV).

Una vez evaluados estos resultados, es posible decir que, al menos hubo un 5% de interacciones inhibitorias entre los actinomicetos del cuadrante muestreado. Este porcentaje de inhibición es similar al reportado por Nair y Simidu (1987) quienes encontraron un 2.7% de actividad antibiótica en algunas bacterias aisladas de sedimentos marinos. Sin embargo, es mucho menor que el 53.5% encontrado por Long y Azam (2001) en bacterias de la columna de agua unidas a partículas.

En este trabajo no fue posible comprobar si las inhibiciones detectadas entre los microorganismos fueron debido a la producción de compuestos antimicrobianos. Sin embargo, debido a las características del bioensayo realizado, esta opción es muy probable ya que los actinomicetos se sembraron en medios de cultivo ricos en nutrientes y no habría necesidad de competencia por ellos. A pesar de lo anterior, es necesario considerar las diversas razones por las cuales se pudo dar esta inhibición.

Los microorganismos necesitan de compuestos químicos y de energía disponible para crecer y reproducirse (Brock y Madigan, 1988). Estos compuestos químicos se necesitan para proveer elementos tales como el carbón, el oxígeno, el nitrógeno, el azufre y el fósforo con los cuales se forman las moléculas biológicas. La energía disponible se utiliza para sintetizar estas moléculas y así mantener la vida (Fredrickson y Stephanopoulos, 1981). Para satisfacer estas necesidades básicas los microorganismos entran en una inmensa red de interacciones en las cuales cada uno utiliza una forma diferente de interacción para obtener los compuestos que necesita, generando así lo que conocemos como la cadena alimenticia (Fredrickson y Stephanopoulos, 1981). Estas necesidades e interacciones son las que dan lugar a la competencia entre las bacterias.

Existen dos tipos de competencia (Fredrickson y Stephanopoulos, 1981):

- Competencia indirecta: Es cuando una de las poblaciones bacterianas utiliza un recurso requerido por la otra impidiendo o reduciendo el crecimiento de la segunda.

- Competencia directa: Se da cuando una de las poblaciones bacterianas libera sustancias químicas que tienen un efecto tóxico o de inhibición en la otra población o poblaciones. Cuando las sustancias con efectos tóxicas o inhibitorias son producidas por ambas poblaciones, la relación se conoce como antagonismo. Cuando solamente una población es la que produce la sustancia tóxica o inhibitoria la relación se conoce como amensalismo.

La existencia del antagonismo y el amensalismo comprueba que el crecimiento de una población puede ser afectado por sustancias químicas distintas a las utilizadas para el crecimiento. Por lo tanto, es necesario distinguir entre las sustancias químicas que se utilizan como recursos (las utilizadas para el crecimiento y reproducción) y aquellas que no lo son.

Por falta de pruebas químicas, en este estudio no fue posible determinar con exactitud si la relación encontrada fue de competencia indirecta o directa. Sin embargo, los resultados muestran claramente la inhibición del crecimiento de 50% de las cepas inoculadas sobre las capas de agar que tenían todos los nutrientes necesarios para su crecimiento (Tabla IV).

Es muy poco probable que la bacteria inoculada en el agar inferior buscara algún nutriente en la capa de agar superior para continuar con su crecimiento sobre ésta ya que el agar inferior contenía todos los nutrientes necesarios para su crecimiento. Solo en dos casos se observó que la cepa inoculada previamente subiera hasta la superficie de la capa de agar superior, por lo tanto, excepto en este par de casos, no parece haber evidencias de que

el efecto observado se deba a competencia por algún nutriente entre ambas bacterias. Es probable que la bacteria previamente inoculada estuviera produciendo algún compuesto inhibitorio hacia la bacteria inoculada en la capa de agar superior y, que este compuesto se difundiera a través de la capa de agar para lograr el efecto. En este caso, estaríamos hablando de una competencia directa y de amensalismo.

Cabe la posibilidad de que la inhibición no se esté dando por la producción de compuestos antibacterianos, sino porque los actinomicetos establecidos produzcan un cambio en el pH del medio o que exista una producción de peróxidos y ácidos que impidan el crecimiento del otro organismo (Fredrickson y Stephanopoulos; 1981 Rice *et al.*, 1999). Una opción más es que las moléculas producidas por los actinomicetos establecidos sean moléculas bacterioestáticas y no bactericidas, es decir, que solamente detengan el crecimiento de la población, pero no la matan.

Resultados Inesperados

Si extrapolamos la cantidad de actinomicetos en la submuestra que presentaron interacciones de estimulación de crecimiento y estimulación o inhibición de esporulación durante los bioensayos realizados, tendríamos un total de 43 cepas (12 X 3.55) con interacciones de este tipo, es decir, un 12% de la población de actinomicetos pertenecientes al cuadrante de 0.2km² (Tabla V).

Este tipo de interacciones se dan debido a la existencia de un mecanismo con el cual las bacterias detectan y responden a los miembros de su comunidad

a partir de la secreción y asimilación de pequeñas moléculas o señales químicas (Rice *et al.*, 1999). Estas moléculas sirven como señales de monitoreo con las cuales los microorganismos realizan un senso de población, es decir, determinan la concentración de las moléculas presentes y, al detectar una determinada densidad celular, llevan a cabo la acción o respuesta (Rice *et al.*, 1999). En algunos casos esta respuesta se da como la expresión de un fenotipo (Fuqua *et al.*, 1996).

Es sabido que los actinomicetos pueden producir este tipo de señales químicas llamadas autoinductores. Algunas de sus características biológicas como el crecimiento por formación de micelio que culmina en la esporulación, y la habilidad de formar una gran variedad de metabolitos secundarios, incluyendo a la mayoría de los antibióticos, se llevan a cabo por la intervención de factores autorregulatorios (Horinouchi y Beppu, 1992). Estos factores autorregulatorios son sustancias químicas de bajo peso molecular que trabajan a concentraciones muy pequeñas y que son requeridas como factores intrínsecos que activan la formación de metabolitos secundarios y/o morfogénesis (Horinouchi y Beppu, 1992).

Dentro de estos autoinductores encontramos algunos como el factor-A , el cual activa la producción de estreptomicina y la esporulación en los streptomicetos (Horinouchi y Beppu, 1992). Se ha comprobado la existencia de factores homólogos al factor-A que tienen estructuras parecidas pero no todos los efectos producidos por él (Yamada *et al.*, 1987). Existen otros factores que logran estimular el crecimiento de células durmientes de algunos actinomicetos

(Mukamolova *et al.*, 1998). Si consideramos que algunos de estos factores pueden ser producidos por los actinomicetos aislados en este trabajo, es posible suponer que fue la presencia de este tipo de moléculas la que causó la sobreesporulación de algunos de los organismos inoculados sobre la capa de agar. Es probable que el actinomiceto establecido produjera un autoinductor que afectara también a la cepa invasora, logrando que esta última creciera o esporulara sobre él. Es decir, produce algún metabolito que otro organismo detecta como propio y empieza a realizar la acción.

Este estudio demuestra solo algunas de las interacciones ecológicas que tienen entre sí los actinomicetos que habitan los sedimentos marinos. Estos microorganismos presentan diversas estrategias para convivir y protegerse de otros organismos con quienes cohabitan dentro de su ambiente natural. Es muy difícil comprender a fondo todas las relaciones, para ello sería necesario realizar estudios químicos que permitieran demostrar algunas de las suposiciones aquí presentadas. Sin embargo, este es el primer estudio realizado acerca de las interacciones ecológicas entre actinomicetos pertenecientes al mismo ambiente o nicho y en él se demuestra la existencia de dichas interacciones.

CONCLUSIONES

1. Existen al menos 370 cepas de actinomicetos en los sedimentos de un cuadrante de 0.2 km² de sedimentos marinos cercanos a la costa de las playas de La Jolla, C.A. EUA.
2. El 28% de los actinomicetos aislados depende altamente de condiciones salinas para su crecimiento.
3. El 14% de los actinomicetos aislados se pueden considerar como derivados del ambiente marino.
4. Las cepas que presentaron mayor actividad de inhibición contra otras cepas fueron:
 - a. CNQ181 aislada de una profundidad de 47 m.
 - b. CNQ402 aislada de una profundidad de 35 m.
 - c. CNQ490 aislada de una profundidad de 40 m.
 - d. CNQ335 aislada de una profundidad de 46 m.
 - e. CNQ521 aislada de una profundidad de 43 m.
 - f. CNQ655 aislada de una profundidad de 33 m.
 - g. CNQ668 aislada de una profundidad de 42 m.
5. El 19% de los actinomicetos aislados de este cuadrante muestran la inhibición del crecimiento de microorganismos de su orden y/o presentes en su hábitat.
6. Las inhibiciones observadas tienen una alta probabilidad de haber sido causadas por la producción de compuestos antibacterianos.
7. Al menos el 5% de los organismos presentes en una población de actinomicetos, localizada en un cuadrante de 0.2 km² de sedimentos marinos cercanos a la costa, compite entre sí utilizando estrategias de inhibición de crecimiento. Al menos el 12% de ellos muestran interacciones causadas por factores químicos que estimulan o detienen la esporulación de otros actinomicetos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Austin, B. 1988. Marine Microbiology. Cambridge University Press, New York. 222pp.
2. Bernan, S.V. 2001. Metabolites of free-living, commensal, and symbiotic benthic marine microorganisms. En: McClintock B.J. and Baker, J.B. (eds). Marine Chemical Ecology. CRC Press, NY. 601pp.
3. Berthelet, M MacLeod, R.A. 1991. The role of Na⁺ in membrane transport and respiration in the marine bacterium *Deleya aesta* 134. Canadian Journal of Microbiology. **37**:433-339.
4. Brock, D.T. Madigan, T.M. 1988. Biology of Microorganisms. 5a ed. Prentice Hall, New Jersey. 834pp.
5. Demain, L.A. 1995. Why do microorganisms produce antimicrobials? En: Hunter, P.A. Darby, G.K. Russell, J.N. Fifty Years of Antimicrobials: Past Perspectives and Future Trends. University Press, Cambridge. 372pp.
6. El-Nakeeb, M.A. Lechevalier, H.A. 1962. Selective isolation of aerobic actinomycetes. Applied Microbiology. **11**:75-77.
7. Ensign, C.J. 1992. Introduction to the actinomycetes. En: The Prokaryotes. Dworkin, M. Falkow, S. Rosenberg, E. Scheifer, K.H. Stackbrandt, E. (eds). acceso a página de internet: <http://link.spinger-ny.com/link/service/books/10125/>
8. Faulkner, D.J. 1993. Academic chemistry and the discovery of bioactive marine natural products. En: Attaway, H.D. y Zaborsky, R.O. (eds). Marine Biotechnology. Plenum Press. New York. 500pp.
9. Fenical, W. Jensen, R.P. 1993. Marine microorganisms: a new biomedical resource. En: Attaway, H.D. y Zaborsky, R.O. (eds). Marine Biotechnology. Plenum Press. New York. 500pp.
10. Foster, T.J. 1983. Plasmid-determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria. Microbiological Reviews. **47**:361-409.
11. Fredrickson, G.A. Stephanopoulos, G. 1981. Microbial competition. Science. vol. 213. **28**:972-979.
12. Fuqua, C. Winans, S.C. Greenberg, E.P. 1996. census and consensus in bacterial ecosystems: the luxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. Annual Reviews of Microbiology. **50**:727-751.

13. Goodfellow, M. Haynes, J.A. 1984. Actinomycetes in marine sediments. En: Ortiz-Ortiz, L. Bojalil, F.L. Yakoleff, V. (eds). Biological, Biochemical and Biomedical Aspects of Actinomycetes. Academic Press, INC. New York. 643pp.
14. Goodfellow, M. Williams, E. 1986. New strategies for selective isolation of industrially important bacteria. Biotechnology and Genetics Engineering Reviews. **4**:213-262.
15. Gottlieb, D. 1973. General consideration and implications of the actinomycetales. En: Sykes, G. y Skinner, A.F. Actinomycetales: Characteristics and Practical Importance. Academic Press. New York.
16. Grein, A. Meyers, S.P. 1958. Growth characteristics and antibiotic production of actinomycetes isolated from littoral sediments and material suspended in sea water. Journal of Bacteriology. **76**:457-463.
17. Horinouchi, S. Teruhiko, B. 1992. Autoregulatory factors and communication in actinomycetes. Annual Reviews in Microbiology. **42**:377-398.
18. Jensen, R.P. Dwight, R. Fenical, W. 1991. Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 57. **4**:1102-1108.
19. Jensen, R.P. Fenical, W. 1994. Strategies for the discovery of secondary metabolites from marine bacteria: ecological perspectives. Annual Reviews on Microbiology. **48**:559-584.
20. Kerr, A. Tate, M. E. 1984. Agrocins and the biological control of crown gall. Microbiological Science. **1**:1-4.
21. Kuster, E. Williams, S.T. 1964. Selection of media for isolation of streptomycetes. Nature. **202**:928-929.
22. Lemos, L.M. Dopazo, C.P. oranzo, E.A. Barja, L.J. 1991. Competitive dominance of antibiotic-producing marine bacteria in mixed cultures. Journal of Applied Bacteriology. **71**:228-232.
23. Long, R. Azam, F. 2001. Antagonistic interactions among marine pelagic bacteria. Applied and Environmental Microbiology. Vol 67. **11**:4975-5983.

24. Nair, S. Simidu, U. 1987. Distribution and significance of heterotrophic marine bacteria with antibacterial activity. *Applied and Environmental Microbiology*. vol. 53. 12:2957-2962.
25. Oh, S. Kogure, K. Ohwada, K. Simidu, U. 1991. Correlation between possession of a respiration-dependent Na⁺ pump and Na⁺ requirement for growth of marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 57:1844-1846.
26. Paul, V.J. 1992 *Ecological Roles of Marine Natural Products*. Cornell University Press, Ithaca, NY. 245pp
27. Powers, M.E. 1995. Efficacy of the Ryu nonstaining KOH technique for rapidly determining gram reactions of food-borne and waterborne bacteria and yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 61 10:3756-3758.
28. Rice, A.S. Givskov, M. Steinberg, P. Kjelleberg, S. 1999. Bacterial signals and antagonists: the interaction between bacteria and higher organisms. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. vol. 1. 1:23-31.
29. Rosenfeld, W.D. y zobell, C. 1947. Antibiotic production by marine microorganisms, *Journal of Bacteriology*. 54:393-398.
30. Rothrock, S.C. Gottlieb, D. 1984. Role of antibiosis in antagonism of *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* to *Rhizoctonia solani* in soil. *Canadian Journal of Microbiology*. 30:1440-1447.
31. Schauder, S Bassler, L.B. 2001. The languages of bacteria. *Genes and Development*. 15:1468-1480.
32. Slattery, M. Rajbhandari, I. Wesson, K. 2001. Competition-mediated antibiotic induction in the marine bacterium *Streptomyces tenjimariensis*. *Microbial Ecology*. 41:90-96.
33. Weisburg, W.G. Barns, M.S. Pelletier, A.D. Lane, J.D. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*. 173:697-703.
34. Weyland, H. 1981. Distribution of actinomycetes on the sea floor. En: Shaal y Pulverer (eds). *Actinomycetes*. *Zeitschrift Bakterien Supplement*. 11:185-193.
35. Weyland, H. Heimke, E. 1988. Actinomycetes in the marine environment. En: *The Biology of Actinomycetes '88 Proceedings of the 7th International*

Symposium on the Biology of Actinomycetes, Okami, Y. Beppu, T. Ogawara, H. (eds). Japan Science Society, Japan, 1988. 294pp.

36. Wiener, P. 1996. Experimental studies on the ecological role of antibiotic production in bacteria. *Evolutionary Ecology*. **10**:405-421.
37. Williams, D.H. Stone, M.J. Hauck, P.R. K.S. Rahman. 1989. Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized? *Journal of Natural Products*. **52**:1189-1208.
38. Williams, S.T. y Vickers, C.J. 1986. The ecology of antibiotic production. *Microbial Ecology*. **12**:43-52.
39. Yamada, Y. Sugamura, K. Kondo, K. Yanagimoto, M. Okada, H. 1987. The structure of inducing factors for virginiamycin production in *Streptomyces virginiae*. *Journal of Antibiotics*. **40**:496:504.

ANEXO I

Localización y Profundidad de las Estaciones Muestreadas

Estación	Posición Geográfica	Profundidad (m)
1	32° 53.011' N 117° 16.091' W	35
2	32° 53.017' N 117° 16.166' W	40
3	32° 52.996' N 117° 16.263' W	46
4	32° 53.030' N 117° 16.368' W	51
5	32° 53.107' N 117° 16.386' W	51
6	32° 53.109' N 117° 16.337' W	49
7	32° 53.106' N 117° 16.299' W	47
8	32° 53.093' N 117° 16.286' W	46
9	32° 53.084' N 117° 16.223' W	43
10	32° 53.079' N 117° 16.173' W	40
11	32° 53.092' N 117° 16.101' W	35
12	32° 53.134' N 117° 16.092' W	34
13	32° 52.984' N 117° 16.059' W	33
14	32° 52.980' N 117° 16.091' W	35
15	32° 52.957' N 117° 16.097' W	37
16	32° 52.929' N 117° 16.150' W	40
17	32° 52.883' N 117° 16.033' W	33
18	32° 52.836' N 117° 16.067' W	37
19	32° 52.820' N 117° 16.115' W	40
20	32° 52.817' N 117° 16.162' W	43

21	32° 52.816' N 117° 16.217' W	47
22	32° 52.829' N 117° 16.257' W	49
23	32° 52.826' N 117° 16.306' W	52
24	32° 52.850' N 117° 16.306' W	52
25	32° 52.900' N 117° 16.290' W	49
26	32° 52.882' N 117° 16.249' W	48
27	32° 52.868' N 117° 16.194' W	45
28	32° 52.853' N 117° 16.133' W	42
29	32° 52.845' N 117° 16.059' W	36
30	32° 52.831' N 117° 16.012' W	33
31	32° 52.812' N 117° 15.976' W	30
32	32° 52.876' N 117° 15.989' W	32
33	32° 52.869' N 117° 16.037' W	33
34	32° 52.858' N 117° 16.076' W	37
35	32° 52.845' N 117° 16.139' W	40
36	32° 52.842' N 117° 16.188' W	44
37	32° 52.838' N 117° 16.215' W	46
38	32° 52.837' N 117° 16.260' W	49
39	32° 52.833' N 117° 16.312' W	52
40	32° 52.451' N 117° 16.458' W	152
41	32° 51.969' N 117° 16.633' W	305